谷氨酸棒状杆菌异源合成萜类化合物的研究进展*

徐硕，卢文玉**

（天津大学化工学院生物工程系 系统生物工程教育部重点实验室 天津化学化工协同创新中心合成生物学平台 天津 300072）

摘要　萜类化合物具有可观的商业价值，但生产过程复杂，产量低，利用微生物异源合成萜类化合物已成为热点。谷氨酸棒状杆菌内含合成萜类色素的途径，具有异源合成萜类化合物的天然优势和研究前景。首次对谷氨酸棒状杆菌合成萜类化合物进行了综述，从萜类合成途径、关键酶和全局调控机制三个方面进行了途经介绍。概述了谷氨酸棒状杆菌中单萜、倍半萜、四萜类化合物的异源合成，并对利用谷氨酸棒状杆菌高效合成萜类化合物所需解决的问题进行讨论，为谷氨酸棒状杆菌高效合成萜类化合物提供建议。

关键词　谷氨酸棒状杆菌　萜类　异源合成

Progress of Heterologous Biosynthesis of terpenoids in Engineered *Corynebacterium glutamicum*

XU Shuo, LU Wen-yu**

(Department of Biological Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, SynBio Research Platform, Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering, Tianjin 300072, China)

Abstract　Terpenoids have considerable commercial value, but the production process is complex and the yield is low. It has become a hot spot to synthesize terpenoids from microorganism. *Corynebacterium glutamicum* contains a pathway to produce carotenoid, which is a natural advantage for the synthesis of terpenoids heterologously. The synthesis of terpenoids from *C. glutamicum* is summarized, including the terpenoids synthesis pathway in *C. glutamicum*, key enzymes and global regulatory mechanisms in this pathway. And the advances in this pathway in synthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and tetraterpenes are summarized. The problems and advice efficient synthesis of terpenoids by *C. glutamicum* is discussed.

Key words　*Corynebacterium glutamicum*　Terpenoids　Heterologous biosynthesis

萜类化合物是异戊二烯的聚合体及其衍生物的统称，广泛应用于食品、化妆品和医药等领域。按照所含异戊二烯单位的差异，可以分为单萜（C10）、倍半萜（C15）、二萜（C20）、三萜（C30）和四萜（C40）等[1]。自然界中，萜类化合物分布广泛，具有镇痛、抗癌、抗氧化等功能[2,3,4]。萜类化合物合成途径包括甲羟戊酸（MVA）途径和脱氧木酮糖-5-磷酸（MEP）途径，其中MVA途径存在于真核生物、古细菌和少数细菌中，MEP存在于大多数细菌和植物质体中[5,6]。目前萜类化

*收稿日期：2018-11-02 修回日期：2018-11-28

* 本文系国家自然科学基金项目（21878220）的研究成果之一

** 通讯作者，电子信箱：wenyulu@tju.edu.cn

合物主要从植物中提取或化学合成[7,8]。植物原料中萜类的含量低，制备过程易受杂质干扰，分离困难，而且部分植物对生长环境要求严格，生长缓慢，造成提取工艺复杂，产量低，成本高，对环境造成污染。化学合成方法则要面临化石原料的不可再生问题。近年来，随着合成生物学的发展，利用生长快，遗传背景清晰，易于操作的微生物合成天然产物成为研究热点，并取得了一定进展[9,10]。谷氨酸棒状杆菌是一种被广泛应用于氨基酸工业生产的革兰氏阳性菌，近年来也作为合成异丁醇和二元胺等高附加值化合物的底盘[10]，基因组测序的完成和基因编辑技术的完善，为这一内含萜类色素途径的底盘菌合成萜类提供了良好的基础。本文针对谷氨酸棒状杆菌异源合成萜类化合物的研究进展进行综述，并对谷氨酸棒状杆菌高效合成萜类化合物提供建议。

1 谷氨酸棒状杆菌萜类化合物生物合成途径

谷氨酸棒状杆菌萜类化合物生物合成途径如图 1 所示。谷氨酸棒状杆菌具有完整的 MEP 途径，以及下游用于合成自身癸异戊二烯黄素的全部基因。在 MEP 途径中，3-磷酸甘油醛和丙酮酸经由 7 步反应生成异戊烯基焦磷酸（IPP），在异构酶 IDI 的作用下生成二甲基烯丙基焦磷酸（DMAPP）。在 *idsA* 和 *crtE* 编码的香叶基香叶基焦磷酸合成酶（GGPPS）作用下，由 IPP 和 DMAPP 最终生成香叶基香叶基焦磷酸（GGPP）[11]。野生型谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 中，癸异戊二烯黄素合成基因由两组基因簇组成，第一组包含 *crtE*, *cg0722*, *crtB*, *crtI*, $crtY_e$, $crtY_f$, *crtEb*，分别编码香叶基香叶基焦磷酸合成酶、假定的 RND 超家族药物输出蛋白、八氢番茄红素合成酶、八氢番茄红素脱氢酶、类胡萝卜素 C45/C50ε-环化酶以及番茄红素延长酶。第二组包含 *crtB2*, *crtI2-1*, *crtI2-2*，其中 *crtB2* 编码第二个八氢番茄红素合成酶，余下两个基因无八氢番茄红素脱氢酶活性。IPP 和 DMAPP 在两组基因簇编码的酶作用下，最终生成癸异戊二烯黄素[12]。

1.1 谷氨酸棒状杆菌萜类化合物前体合成途径中的关键酶

脱氧木酮糖-5-磷酸合酶（DXS）是上游 MEP 途径中的关键限速酶。以两种不同的方式过表达 *dxs*，均能提高谷氨酸棒状杆菌胞内 DXS 量，增加产物番茄红素的积累，其中以 IPTG 为诱导剂的诱导型启动子质粒过表达 *dxs*，番茄红素从 0.04±0.01mg/g(CDW) 提高到 0.06±0.01mg/g(CDW)，以谷氨酸棒状杆菌自身携带用于启动延伸因子 EF-Tu 的强启动子 *tuf* 替换基因组上 *dxs* 原始启动子，番茄红素产量提高两倍，达到 0.08±0.01mg/g(CDW)，过表达 MEP 途径中的其他基因与过表达 *dxs* 无明显的协同作用[13]。

IspG 和 IspH 为 MEP 途径中的两种铁硫蛋白[14,15]，IspH 催化生成 IPP 和 DMAPP 并不等量[16]，在谷氨酸棒状杆菌 LYC3-MEP 中过表达 *idi*，番茄红素产量相对于谷氨酸棒状杆菌 LYC3-MEP 提高两倍[13]。

谷氨酸棒状杆菌中，IdsA 为主要的 GGPPS，CrtE 为辅助补充的作用。IdsA 和 CrtE 的最适催化温度分别为 30-35℃和 25℃。两者均能将 IPP 与 DMAPP、香叶基焦磷酸（GPP）、法尼基焦磷酸（FPP）缩合合成 GGPP，IdsA 以 IPP 和 DMAPP 为底物时生成 GGPP 的效率最高，CrtE 以 GPP 和 IPP 为底物时生成 GGPP 的效率最高。过表达 *idsA*，谷氨酸棒状杆菌积累番茄红素，同时过表达 *idi*，平衡胞内 IPP 和 DMAPP 的量，可解除番茄红素的积累[11]。

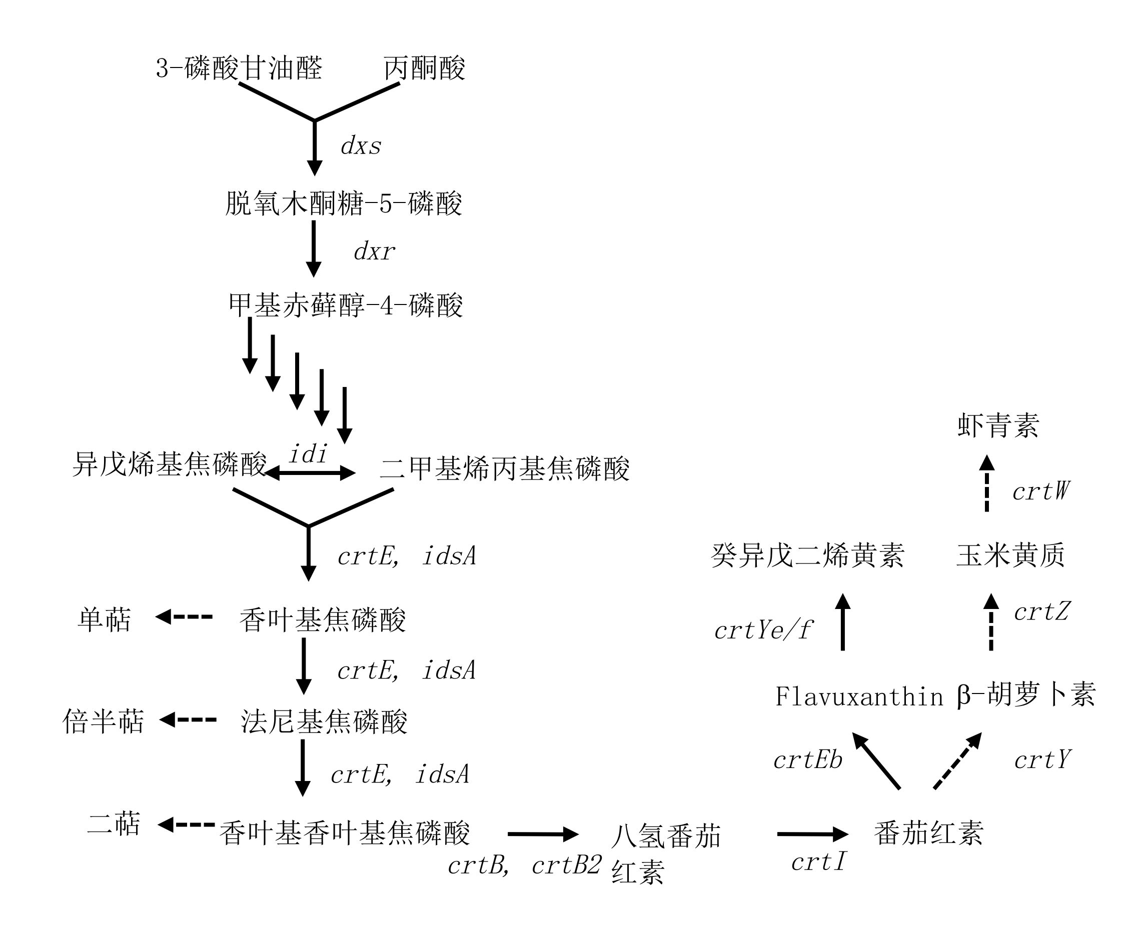


图 1 谷氨酸棒状杆菌萜类化合物生物合成途径

Fig.1 Biosynthesis pathway of terpenoids in *Corynebacterium glutamicum*

1.2 谷氨酸棒状杆菌萜类化合物生物合成途径中的全局调控机制

作为 RNA 全酶的亚基，σ因子在启动子识别和转录启动方面至关重要，调节σ因子有利于菌株提高产物耐受性以及产量[17]。Taniguchi 等[18]在谷氨酸棒状杆菌中过表达了 7 种σ因子编码基因，其中 *sigA* 使番茄红素产量提高 8 倍，在谷氨酸棒状杆菌原始菌中，过表达 *sigA*，在稳定期谷氨酸棒状杆菌合成癸异戊二烯黄素的产量提高 2 倍。在过表达 *sigA* 的菌株中，有关硫胺素合成和芳香族化合物降解的基因转录水平提高，硫胺素是脱氧木酮糖-5-磷酸合成酶 DXS 的重要辅因子[19]，在培养基中加入 10μg/L 的硫胺素或 300mg/L 源儿茶酸，癸异戊二烯黄素产量分别提高 10%和 40%。删除 *sigB* 基因，番茄红素产量提高 5 倍。

大多数的多重抗生素抗性（MarR）家族转录调节基因具有转录抑制功能，其中 *crtR* 在海分支杆菌中起着调节 *crt* 操纵子转录的功能，当 *crtR* 因转位插入失活时，海分支杆菌的癸异戊二烯黄素积累提高到原来的 3 倍[20]。谷氨酸棒状杆菌中存在其直向同源基因，Henke 等[21]对在 crtE 基因上游约 200bp 处的 *crtR* 基因进行研究表明，删除 *crtR* 使 *crt* 操纵子转录水平提高 10 到 70 倍，癸异戊二烯黄素的积累量有 10 到 30 倍的提升。同时对其作用机理进行了初步研究，发现 *CrtR* 结合在 *crtR* 和 *crtE* 基因间的 *crt* 操纵子-10 和-35 启动子区。

2 谷氨酸棒状杆菌萜类合成途径的具体应用

谷氨酸棒状杆菌类胡萝卜素生物合成途径的中间代谢物 IPP 和 DMAPP 为萜类合成共同的前体物质，其中香叶基焦磷酸、法尼基焦磷酸和香叶基香叶基焦磷酸分别为单萜、倍半萜和二萜类化合物的直接前体。对该途径的解析为谷氨酸棒

状杆菌异源合成萜类化合物提供了理论基础。近年来，以谷氨酸棒状杆菌为底盘菌合成萜类化合物取得了一定的进展，分别从单萜、倍半萜和四萜三方面进行阐述。

2.1 单萜

单萜类化合物种类繁多，大多存在于植物挥发油中，具有抗菌、消炎和抗癌等功效，广泛应用于食品、医药和化妆品行业[22]。香叶基焦磷酸（GPP）是单萜类化合物的直接前体，经由香叶基焦磷酸合成酶（GPPS）催化得到。谷氨酸棒状杆菌中的 *crtE* 和 *idsA* 基因均为编码香叶基香叶基焦磷酸合酶（GGPPS）的基因，目前尚无相关研究表明两者是否释放中间物 GPP。

Kang 等[23]以野生型谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 为出发菌株，构建了异源合成蒎烯的工程菌。单独表达蒎烯合酶，不能检测到蒎烯，共表达来自火炬松的蒎烯合酶基因和大冷杉来源的香叶基焦磷酸合酶基因，过表达 *dxs* 和 *idi* 增加前体 IPP 和 DMAPP 的供应，蒎烯产量达到 27±7μg/g(CDW)。因单萜类化合物普遍存在抑菌作用，Kang 等对蒎烯在谷氨酸棒状杆菌中的毒性进行了研究，以培养体系中加入 20%正十二烷作为原位提取的有机相，消除了蒎烯对谷氨酸棒状杆菌的生长抑制作用。

2.2 倍半萜

倍半萜类化合物广泛存在于各种植物中，常以醇、酮、内酯等形式存在于挥发油中，是挥发油中高沸点部分的主要成分，多具有香气和生物活性。法尼基焦磷酸（FPP）是其共同前体，目前尚无研究表明谷氨酸棒状杆菌中的 *crtE* 和 *idsA* 基因具有或释放 FPP 的活性。

朱栾倍半萜是一种柑橘类水果中的芳香物质，广泛应用于风味物质和饮品的制作过程中。除此之外，朱栾倍半萜能氧化成为诺卡酮，一种具有西柚风味的高价值香料[24]。Frohwitter 等[25] 成功在野生型谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 中构建了朱栾倍半萜的异源合成途径，在单独导入来自甜橙的朱栾倍半萜合成酶基因时，并不能检测到朱栾倍半萜的生成，推断可能是缺少合成前体 FPP 的供应。但将 *crtE* 和 *idsA* 基因替换为来自大肠杆菌的 *ispA* 和来自酿酒酵母的 *ERG20* 基因时，便能检测到朱栾倍半萜的生成。在删除 *crtE* 和 *idsA* 基因的基础上，共表达 *ispA* 基因和来自黄扁柏的朱栾倍半萜合成酶基因，朱栾倍半萜的产量达到 2.41±0.26mg/L，相当于 0.25±0.03mg/g(CDW)。

与单萜类似，倍半萜也存在对菌体生长的抑制作用，Frohwitter 等从转录组的角度，揭示正十二烷作为谷氨酸棒状杆菌发酵液中朱栾倍半萜提取相对菌体的生长几乎无影响，并能消除朱栾倍半萜对菌体的抑制作用。并通过对比分析有无朱栾倍半萜胁迫条件下谷氨酸棒状杆菌转录组，揭示基因 *mmpl2* 编码的蛋白可能对胞内的朱栾倍半萜有输出作用，从而减轻朱栾倍半萜对菌体生长的抑制。

2.3 四萜

分子中含有八个异戊二烯单位的化合物为四萜类化合物，自然界中分布广泛，很多天然色素如番茄红素、β-胡萝卜素和虾青素等类胡萝卜素均属于该类。类胡萝卜素广泛应用于食品和饲料等行业，具有很高的商业价值[26]。谷氨酸棒状杆菌中含有糖基化的 C50 类胡萝卜素癸异戊二烯黄素。癸异戊二烯黄素经谷氨酸棒状杆菌内含的萜类合成途径生成[19]。

(1)番茄红素

番茄红素众所周知是源于番茄的一种红色色素，因其独特的生物活性，在

预防人类心血管疾病方面有突出效果，被广泛应用于食品、医药等行业[27]。谷氨酸棒状杆菌中番茄红素的前体物质 GGPP 经两步反应生成番茄红素。

Heider 等[12]删除谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 中转化番茄红素流向癸异戊二烯黄素的基因 *crtEb*，番茄红素在谷氨酸棒状杆菌中积累达到 0.03±0.01mg/g(CDW)，同时过表达将 GGPP 转化为番茄红素的途径基因 *crtE*, *crtB*, *crtI*，番茄红素的产量提高 80 倍到 2.4±0.3mg/g(CDW)。通过过表达 MEP 途径基因，优化 IPP 前体供应，在谷氨酸棒状杆菌 MB001 Δ$crtY_eY_fEb$ 中，番茄红素的产量进一步提高到 0.08±0.02mg/g(CDW) [13]。

Matano 等[28]在谷氨酸棒状杆菌 MB001 Δ*crtYEB* 中，成功构建利用乙酰氨基葡萄糖的代谢通路，工程菌利用乙酰氨基葡萄糖产番茄红素达到 17.4±0.4mg/g(CDW)。Hadiati 等[29]构建了利用己糖醛酸为碳源的谷氨酸棒状杆菌，利用半乳糖醛酸合成番茄红素达 0.7±0.1mg/g(CDW)，利用葡萄糖醛酸合成番茄红素达 0.8±0.3mg/g(CDW)。

(2)虾青素

虾青素是一种红色的 C40 萜类色素，因其分子结构的特殊性决定了其具有较高的抗氧化活性，因此，虾青素被广泛应用于保健品、化妆品和药品行业[30]。

Heider 等[13]以积累番茄红素的谷氨酸棒状杆菌为底盘，导入番茄红素环化酶基因 *crtY*、β-胡萝卜素酮化酶基因 *crtW* 以及羟化酶基因 *crtZ*，成功合成虾青素 1.2±0.5mg/g(CDW)。Henke 等[31]通过组合不同的核糖体结合位点、位点与基因间距离和翻译起始密码的手段平衡 *crtW* 和 *crtZ* 的表达水平，进一步将虾青素产量提高到 1.7±0.3mg/g(CDW)，与目前藻类产虾青素相当。

3 谷氨酸棒状杆菌异源合成萜类途径调节新方法

3.1 新诱导方式的应用

诱导表达系统经常被用于异源蛋白的生产，为实现产量最大化，传统的诱导方式需做大量的工作来确定最佳的诱导时间和诱导剂添加量，而以光敏笼困型 IPTG 为诱导剂的新型诱导系统具有容易自动化，无攻击性和污染风险等多种优势[32]。Binder 等[33]以谷氨酸棒状杆菌为微生物底盘异源合成朱栾倍半萜，以光敏笼困型 IPTG 为诱导剂的新型诱导系统调控朱栾倍半萜的合成，将朱栾倍半萜的产量提高了 6 倍，达到 41.0mg/L。

3.2 基因组编辑技术和转录调控的改进

利用微生物为底盘菌异源合成萜类化合物，往往需要导入大量的外源基因，对底盘菌的代谢造成一定的负担。能简单高效的调节代谢途径中的基因，实现产量产率最大化，减小代谢负担的方法是必要的。近年来短回文重复序列（CRISPR）相关技术发展迅猛，为这一目标的实现提供了基础。Kim 等[34]利用 CRISPR 干扰技术，实现了在大肠杆菌中异源合成甜没药醇和番茄红素过程的转录调控，成功将产量提高。Yu 等[35]成功在谷氨酸棒状杆菌中构建 CRISPR-Cpf1 系统，并在谷氨酸棒状杆菌中成功实现γ-谷酰基激酶 G149 位点的饱和突变，解除 L-脯氨酸抑制，为该技术应用于谷氨酸棒状杆菌萜类异源合成的转录调控提供了基础。

4 结论和展望

以上研究进展表明，谷氨酸棒状杆菌作为微生物底盘合成四萜类化合物已取得了一定的成果，但对于单萜、倍半萜和三萜等则处于起步阶段，仍存在诸多的问题需要解决。

例如，尽管在谷氨酸棒状杆菌中成功合成了单萜和倍半萜，但对 *crtE* 和

idsA 基因所编码的酶是否具有合成或释放 GPP 或 FPP 的能力尚有待进一步研究。突变酿酒酵母 *ERG20* 基因，使 GPP 游离，单萜产量可以得到显著提升[36]，突变 *crtE* 和 *idsA* 基因可能会带来同样的效果。谷氨酸棒状杆菌中萜类合成的前体供应研究仅集中在 MEP 途径，尝试导入外源 MVA 途径也是一个值得期待的选择。例如，Liu 等通过导入来源于粪肠球菌的 MVA 途径上游途径和酿酒酵母来源的 MVA 下游途径，使大肠杆菌产鲨烯的产量提高 4.87 倍[37]。另一方面，通过截断和融合蛋白技术，也有望使简单萜类的产量进一步提高。例如 Jiang 等[36]通过截断香叶醇合酶 N 端并与突变的 *ERG20* 融合，使酿酒酵母香叶醇产量从 43.19mg/L 提高到 523.96mg/L。

此外，不同的外源途径导入底盘菌中，存在适配性的问题。如不同来源的香叶醇合成酶在酿酒酵母中合成香叶醇的量有很大的差异[36]，而对于同一外源基因，在不同的底盘中也会有较大的表达差异[38]。因此探索更多的萜类合成酶以及扩展更多的生物底盘对于萜类的异源合成也有重要的意义。

另外，仍有很多具有高附加值的萜类化合物的生物合成途径并未被解析清楚，大量的研究只停留在合成中间体的阶段。例如，蓖麻烯被认为是大戟科中其它复杂二萜化合物的中间物，如佛波醇等，然而对于如何从蓖麻烯合成佛波醇这一详细途径缺乏研究[39]。佛波醇是一种应用在抗艾滋病方面的酪氨酸激酶抑制剂 prostratin 的前体，具有更高的价值[40]。因此，对于萜类化合物合成途径解析以及相关的基础研究也应更进一步。

参考文献

[1] Kirby J, Keasling J D. Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. Annual Review of Plant Biology, 1958, 60(1):335-355.

[2] Chirumbolo S, Bjorklund G. The Antinociceptive Activity of Geraniol. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2017, 120(2):105-107.

[3] Wei H H, Zhang H L, Xing-Tai L I. Research Progress in Pharmacological Activities of Ginsenoside Re. Journal of Dalian Minzu University, 2018.

[4] Motallebnejad M, Molania T, Moghadamnia A A, et al. Antioxidant effect of lycopene on oral mucositis in gamma radiation protection in rats (A preliminary study). Journal of Mazandaran University of Medical Sciences, 2018, 27(159):137-142.

[5] Rohmer M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. Nat.prod.rep, 1999, 16(5):565-574.

[6] Rodríguez-Concepción M, Boronat A. Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics. Plant Physiology, 2002, 130(3):1079-1089.

[7] 陈鹏飞. 植物中萜类化合物的提取方法研究进展. 中文信息, 2017, 2:259.

Chen P F. Progress in extraction of terpenoids from plants. Chinese Information, 2017, 2:259.

[8] Lin S C, Chein R J. Total Synthesis of the Labdane Diterpenes Galanal A and B from Geraniol. Journal of Organic Chemistry, 2017, 82(3):1575-1583.

[9] Wu W, Liu F, Davis R W. Engineering *Escherichia coli* for the production of terpene mixture enriched in caryophyllene and caryophyllene alcohol as potential aviation fuel compounds. Metabolic Engineering Communications, 2018, 6:13-21.

[10] Lee J Y, Na Y A, Kim E, et al. The actinobacterium *Corynebacterium glutamicum*, an industrial workhorse. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2016, 26(5):807.

[11] Heider S A, Peters-Wendisch P, Beekwilder J, et al. IdsA is the major geranylgeranyl pyrophosphate synthase involved in carotenogenesis in *Corynebacterium glutamicum*. Febs Journal, 2015, 281(21):4906-4920.

[12] Heider S A E, Petra P W, Wendisch V F. Carotenoid biosynthesis and overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. Bmc Microbiology, 2012, 12(1):198-198.

[13] Heider S A E, Wolf N, Hofemeier A, et al. Optimization of the IPP Precursor Supply for the Production of Lycopene, Decaprenoxanthin and Astaxanthin by *Corynebacterium glutamicum*. Frontiers in Bioengineering & Biotechnology, 2014, 2:28.

[14] Lee M, Gräwert T, Quitterer F, et al. Biosynthesis of isoprenoids: crystal structure of the [4Fe-4S] cluster protein IspG. Journal of Molecular Biology, 2010, 404(4):600-610.

[15] Gräwert T, Kaiser J, Zepeck F, et al. IspH protein of *Escherichia coli*: studies on iron-sulfur cluster implementation and catalysis. Journal of the American Chemical Society, 2004, 126(40):12847-55.

[16] Xiao Y, Zhao Z K, Liu P. Mechanistic studies of IspH in the deoxyxylulose phosphate pathway: heterolytic C-O bond cleavage at C4 position. Journal of the American Chemical Society, 2008, 130(7):2164-5.

[17] Tripathi L, Zhang Y, Lin Z. Bacterial Sigma Factors as Targets for Engineered or Synthetic Transcriptional Control. Frontiers in Bioengineering & Biotechnology, 2014, 2:33.

[18] Taniguchi H, Henke N A, Heider S A E, et al. Overexpression of the primary sigma factor gene sigA, improved carotenoid production by *Corynebacterium glutamicum*: Application to production of β-carotene and the non-native linear C50 carotenoid bisanhydrobacterioruberin. Metabolic Engineering Communications, 2017, 4:1-11.

[19] Vranová E, Coman D, Gruissem W. Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64(1):665.

[20] Krubasik P, Kobayashi M, Sandmann G. Expression and functional analysis of a gene cluster involved in the synthesis of decaprenoxanthin reveals the mechanisms for C50 carotenoid formation. Febs Journal, 2010, 268(13):3702-3708.

[21] Henke N A, Sae H, Hannibal S, et al. Isoprenoid Pyrophosphate-Dependent Transcriptional Regulation of Carotenogenesis in *Corynebacterium glutamicum*. Frontiers in Microbiology, 2017, 8:633.

[22] Brennan T C, Turner C D, Krömer J O, et al. Alleviating monoterpene toxicity using a two-phase extractive fermentation for the bioproduction of jet fuel mixtures in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology & Bioengineering, 2012, 109(10):2513-2522.

[23] Kang M K, Eom J H, Kim Y, et al. Biosynthesis of pinene from glucose using metabolically-engineered *Corynebacterium glutamicum*. Biotechnology Letters, 2014, 36(10):2069-2077.

[24] Girhard M, Machida K, Itoh M, et al. Regioselective biooxidation of (+)-valencene by recombinant *E. coli*, expressing CYP109B1 from Bacillus subtilis, in a two-liquid-phase system. Microbial Cell Factories, 2009, 8(1):36.

[25] Frohwitter J, Heider S A E, Peters-Wendisch P, et al. Production of the sesquiterpene (+)-valencene by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. Journal of Biotechnology, 2014, 191:205-213.

[26] Heider S A, Peterswendisch P, Wendisch V F, et al. Metabolic engineering for the microbial production of carotenoids and related products with a focus on the rare C50

carotenoids. Applied Microbiology & Biotechnology, 2014, 98(10):4355-4368.
[27] Clinton S K. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. Nutrition Reviews, 2010, 56(2):35-51.
[28] Matano C, Uhde A, Youn J W, et al. Engineering of *Corynebacterium glutamicum*, for growth and l -lysine and lycopene production from N -acetyl-glucosamine. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(12):5633-5643.
[29] Hadiati A, Krahn I, Lindner S N, et al. Engineering of *Corynebacterium glutamicum*, for growth and production of L-ornithine, L-lysine, and lycopene from hexuronic acids. Bioresources & Bioprocessing, 2014, 1(1):25.
[30] Grimmig B, Kim S H, Nash K, et al. Neuroprotective mechanisms of astaxanthin: a potential therapeutic role in preserving cognitive function in age and neurodegeneration. Geroscience, 2017, 39(1):1-14.
[31] Henke N A, Heider S A E, Peters-Wendisch P, et al. Production of the Marine Carotenoid Astaxanthin by Metabolically Engineered *Corynebacterium glutamicum*. Marine Drugs, 2016, 14(7):124.
[32] Wandrey G, Bier C, Binder D, et al. Light-induced gene expression with photocaged IPTG for induction profiling in a high-throughput screening system. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1):63.
[33] Binder D, Frohwitter J, Mahr R, et al. Light-Controlled Cell Factories: Employing Photocaged Isopropyl-Î²-d-Thiogalactopyranoside for Light-Mediated Optimization of lac Promoter-Based Gene Expression and (+)-Valencene Biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. Appl Environ Microbiol, 2016, 82(20):6141-6149.
[34] Kim S K, Han G H, Seong W, et al. CRISPR interference-guided balancing of a biosynthetic mevalonate pathway increases terpenoid production. Metabolic Engineering, 2016, 38:228-240.
[35] Yu J, Qian F, Yang J, et al. CRISPR-Cpf1 assisted genome editing of *Corynebacterium glutamicum*. Nature Communications, 2017, 8:15179.
[36] Jiang G Z, Yao M D, Ying W, et al. Manipulation of GES and ERG20 for geraniol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. Metabolic Engineering, 2017, 41:57-66.
[37] Liu H, Zhang W, Gong G, et al. Biosynthesis of Squalene by Introducing Hybrid MVA Pathway in *Escherichia coli*. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2017.
[38] Ohto C, Muramatsu M, Obata S, et al. Overexpression of the gene encoding HMG-CoA reductase in *Saccharomyces cerevisiae*, for production of prenyl alcohols. Applied Microbiology & Biotechnology, 2009, 82(5):837.
[39] Kirby J, Nishimoto M, Park J G, et al. Cloning of casbene and neocembrene synthases from Euphorbiaceae plants and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Phytochemistry, 2010, 71(13):1466-1473.
[40] Reuse S, Calao M, Kabeya K, et al. Synergistic activation of HIV-1 expression by deacetylase inhibitors and prostratin: implications for treatment of latent infection. Plos One, 2009, 4(6):e6093.